《畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术规范》编制说明（征求意见稿）

一、工作简况

1.任务来源

根据江苏省农学会下达的《团体标准管理规定》（国标委联 [2019]1 号）、《中华人民共和国标准化法》（主席令[2017]78 号）和 《江苏省标准监督管理办法》（省政府令[2019]124 号），以期推动畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术规范化，加强畜禽产品安全建设。

2.起草单位、协作单位

本标准起草单位：江苏省农业科学院、许昌学院

3.主要起草人

张 辉、王德国、包红朵、周 艳、张永清、孙军涛

二、制定标准的必要性和意义

为加强畜禽产品致病菌的污染检测扩增技术规范，江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所承担了《畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术规范》农业行业标准的制订任务，依据试验结果起草本标准。

致病菌对食品安全造成的污染已经成为一个世界性的公共卫生问题。研究表明，每年有两百多万人因腹泻病而导致死亡，其中绝大多数是由细菌污染的食物而导致；发达国家每年死于食物中毒的儿童中绝大多数属于细菌性食物中毒。近年来，致病菌污染食物导致中毒的案例越来越多。因而，有必要对畜禽产品中的致病菌检测扩增技术进行规范。

畜禽产品中的致病菌主要包括单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌和产气荚膜梭菌等。作为引起肠胃食物中毒的一种主要细菌，常见的沙门氏菌有猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌以及肠炎沙门氏菌等。在全世界各国引起食物中毒的细菌中沙门氏菌位列榜首，占到了近 30%的比例。蛋、家禽以及肉类产品是该病的主要传播媒介，一旦感染不仅会导致恶心、呕吐、腹泻以及发热，甚至会引起痉挛、抽搐以及昏迷等中枢神经系统症状，病情严重的，甚至会因患上败血症而导致死亡。单核细胞增生李斯特菌主要感染孕妇、儿童、老人及免疫缺陷人群，一旦感染不仅会导致脑膜炎、败血症及单核细胞增多的发生，甚至会导致死亡，该病的

死亡率达到了 30%以上。单核细胞增生李斯特菌已经被列为我国重点检测的一种食源性致病菌。研究表明，当前我国生猪肉中单核细胞增生李斯特菌的检出率约为 18.3%~40.6%；生牛肉中约为 0.7%~14.9%；禽肉中约为 2.5%~17.1%；牛奶中约为 0.3%~2.2%。单核细胞增生李斯特菌即使在冷藏条件下也可以进行生长繁殖，极易产生严重的不良影响。产气荚膜梭菌食物中毒在世界上非常普遍， 其引发的食物中毒是发达国家最常见的胃肠道疾病之一。据估计，产气荚膜梭菌是引起美国食源性疾病的第二大常见细菌，每年造成约 100 万人患病。在英国，产气荚膜梭菌在英格兰和威尔士细菌性食源性疾病中排第三。这是因为，产气荚膜梭菌分布广泛，在人类和动物的肠道中高度流行。其生长速度快，毒素类型多，易引发疾病。产气荚膜梭菌在 12~54℃的温度下均可生长，因此可能在冷却、再加热和熟食热保存的过程中生长。这三种致病菌都极可能在屠宰加工过程中污染畜禽生肉，后经餐饮加工环节交叉污染，从而成为食品安全隐患。

当前传统的微生物检测方法不仅操作烦琐、检验周期长、同时灵敏度较低，不能进行及时有效的检测。因此，必须要加强对致病菌检验及监测技术的研究，从而保证畜禽产品中致病菌的污染调查。在我国尚未形成统一规范的畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术。本标准拟制定相关检测方法和操作规范，对畜禽产品中的致病菌进行测定。

三、主要起草过程

根据项目的实施，项目组开展了以下研究及资料、数据的整理和收集：项目立项之后，江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所成立了以张辉研究员为技术指导专家的标准起草小组，制定了工作方案，具体步骤如下：

为做好《畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术规范》起草工作，起草组在制定标准时力求科学性、可操作性，以科学、谨慎态度，充分参考省内外相关标准，在对现有致病菌梯型熔解温度等温扩增技术实际情况开展了深入调查研究，听取有关人员及业内人士意见的基础上，经过综合分析、充分验证资料、反复讨论和修改，最终确定了本标准的主要内容。

四、主要条款的说明

1　范围

本文件规定了畜禽产品致病菌单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌和产气荚膜梭菌DNA的提取、梯型熔解温度等温扩增、检测及结果判定方法和操作规范。

本文件适用于畜禽产品致病菌的核酸定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 16548 病害动物和病害动物产品生物安全处理规程

GB 4789.30 食品安全国家标准 食品微生物检验单核细胞增生李斯特氏菌检验

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物检验沙门氏菌检验

GB 4789.13 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量安全控制规范 食品分子生物学检测

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

3 主要仪器与试剂

离心机；实时荧光定量 PCR 仪；培养箱；生物安全柜；核酸含量分析仪

DNA 提取试剂盒；Tris-HCl；乙二胺四乙酸（EDTA）；异硫氰酸胍；Triton X-100；异丙醇；TE 溶液 (pH 8.0)；饱和酚；氯仿；异戊醇；TaqDNA 聚合酶；BstDNA 聚合酶；DEPC 水、甜菜碱（Betaine）、dNTPs、MgSO4、ThermoPol™ Reaction Buffer、SYBRGreen I 荧光染料；营养琼脂培养基、液体巯乙醇酸盐培养基（FTG）；TSB-YE 培养基；亚硒酸盐胱氨酸增菌液、亚硫酸铋琼脂。

4 致病菌引物设计

产气荚膜梭菌：

Cp-F3:5’-AGGCGGTGGTGGTGGATTTTGAGCT-GCTTCCATGAGAGCTAT-3’

Cp-B3:5’-CCTCCGCCGCCACTTTTTCCACAACA-GTTCTTTGTCGTG-3’

Cp-FIP:5’-CTCCGCCACCACCGCCGG-3’

Cp-LF:5’-GAGGAGGATCTTCTTCAC-3’

单核细胞增生李斯特菌：

Lm-F3:5’-TGATGTTGGTGTTGCGTTTTGGGCA-ATTAACAGGCGATAACT-3’

Lm-B3:5’-CAGGAGGCGGCGGTTTTTCCAGTTG-TCCCTTCTCCACC-3’

Lm-LF:5’-CGATTTCTTGTTTAATGA-3’

沙门氏菌：

Sa-F3:5’-GAACGTGTCGCGGAAGTC-3’

Sa-B3:5’-CGGCAATAGCGTCACCTT-3’

Sa-FIP:5’-CCGGCCTTCAAATCGGCAT-CAAGCCCGATTTTCTCTGGATGG-3’

Sa-LF:5’-GAACGGCGAAGCGTACTGGAC-ATCGCACCGTCAAAGGAA-3’

5 致病菌 DNA 提取

新鲜肉类、肉干和奶粉等固态样品：烘干、研磨成粉，称取 50 mg，加 200 μL TE 溶液 (pH 8.0)，混匀，加 400 μL 裂解液 [5 mol /L 异硫氰酸胍，0.05 mol /L Tris-HCl (pH 6.4)，0.02 mol /L EDTA (pH 8. 0)，1.3% Triton X-100]，涡旋混匀，加 600 μL 酚：氯仿：异戊醇 (25：24：1)，剧烈振荡 15 s, 13000 r /min 离心 10 min。取上清，加等体积氯仿：异戊醇 (24：1)，剧烈振荡 15 s，13000 r/min 离心 10 min。取上清，加等体积氯仿，剧烈振荡 15 s，13000 r /min 离心 10 min。取上清，加 0.6 倍体积的异丙醇，13000 r /min 离心 10 min。取沉淀, 70%乙醇清洗 1 次，干燥，加 100 μL TE 溶液溶解即提取的总 DNA。牛奶、鸡蛋等液态样品：取 200 μL 液体，加 400 μL 裂解液，后面步骤同固态样品。

注：也可使用商品化的 NucleoSpin® Food 试剂盒提取样品中的总 DNA。

6 等温扩增方法的建立

表 1. 梯型熔解温度等温扩增反应体系

试剂	作用浓度（10 μL）

Bst DNA Polymerase Buffer (10 ×)	1.0 μL
DNA 模板	1.0 μL
引物 F3	0.8 μM
引物 B3	0.8 μM
引物 LF/FIP	0.4μM
甜菜碱（betaine）	1.0 moL
dNTP	1.2 mmoL
$MgSO_4$	4～6.0mmol
SYBR Green	1×
Bst DNA Polymerase（8U/μL）	0.4 μL
水	至终体积 10 μL

反应程序如下：在 55℃下反应 90s，共 40 个循环，通过实时荧光曲线观察扩增结果(本试验可根据实际的扩增情况来随时终止反应)。

7 致病菌检测结果判定

若荧光定量 PCR 仪中扩增结果图中出现指数曲线，则样品中含有引物所对应的致病菌；若扩增结果图中未出现指数曲线，则样品中不含有引物所对应的致病菌。

在样品等温扩增的同时，应设置等温扩增阴性对照、扩增阳性对照和扩增空白对照，实验重复三次。

五、重大分歧意见的处理和依据

无重大分歧意见。

六、采标情况

无。

七、贯彻标准的措施和建议

建议相关的管理部门及时组织各级质量监督检验机构的质量检验人员进行交流和培训，提高检测技术水平，确保广大消费者食品安全。

八、预期效益分析

从经济效益来说，本规程的实施可以有效检测出畜禽产品中的致病菌，其方法具备高效、高特异性、高灵敏度的特点，明显优于普通 PCR，精准的同时缩短了检测时间，减少了人员投入及检测成本，经济效益显著。

从社会效益来说，检测技术是监测和防控畜禽产品致病菌的最重要的环节之一，而梯型熔解温度等温扩增技术的优势尤其适合基层食品检测部门的推广和应用。加强了食品卫生部门的监管力度，能够有效减少致病菌引起的食品安全事件，最大程度的保障了我国食品质量安全。

从生态效益来说，本规程的实施有利于建设良好的食品安全环境，推动农产品产业兴旺，促进农业生产可持续发展，打造标准化绿色食品，以期进一步促进绿色食品产业的发展，为人们创建食品安全环境，具有重要的意义。

九、其它应予说明的事项

无。